

神戸市須磨海岸ではじめて観察されたウスバミル

奈島 弘明* ・ 谷 良夫**

First record of a carpet-like *Codium tenuifolium* Shimada *et al.*
at Kobe Suma seaside

Hiroaki Nashima* and Yoshio Tani**

はじめに

須磨海岸は東部から中央部にかけての砂浜と須磨港西部の丸石と砂を主体とする浜からなる。この場所では筆者の一人、奈島が今までにミルとクロミルを観察している(奈島 2002)。2015 年 4 月 5 日(日)に布状のミルが打ち上げられているものを初めて採集し、ヒラミル *Codium latum* Suringar (吉田 1998)と考えた。しかし、阪口氏より 2015 年 7 月 2 日に神戸市垂水沖で採集された藻体を持参していただき、ウスバミル *Codium tenuifolium* (Shimada *et al.* 2007)の可能性を示唆された。そこで形態と遺伝子の両方から調べてみたのでここに報告する。

方 法

1 形態観察

藻体はさく葉(おし葉)標本として保存した。また、小囊の形態に関しては生もしくはさく葉標本の一部を水で戻し、観察に使用した。小囊の大きさは光学顕微鏡に接眼マイクロメーターを装着して測定した。20 個の小胞を測定し、平均値と標準偏差を求めた。種の検索に当たっては、吉田 (1998), Shimada *et al.* (2007), Lee and Kim (2011), 柴田 (2014) によった。

2 遺伝子解析

DNA 抽出

各藻体(表 1)から Carvalhol *et al.* (2012)の方法を改変した次の方法で DNA の抽出を行った。試料(乾燥標本 3 mm×3 mm)を溶解 Buffer (100mM Tris-HCl pH8.0, 1M KCl, 10mM EDTA, 1% TritonX, 2% SDS) 150 μ L に加える。90°C, 10 分間 インキュベートする。13,000rpm, 4 分間遠心する。上澄 80 μ L にフェ

ノール・クロロホルム溶液を 100 μ L を加え、さらに溶解 Buffer 200 μ L を加える。13,000rpm, 10 分間遠心する。上澄 80 μ L にイソプロパノール 80 μ L を加える。13,000rpm, 10 分間遠心する。上澄を捨てる。70%エタノールを 150 μ L 加える。13,000rpm, 10 分間遠心する。上澄を捨てる、5 分間乾燥させる。TE50 μ L を加え、鋳型 DNA 溶液とした。

PCR 法による DNA 増幅と塩基配列解読(シーケンス)および系統樹の作成

葉緑体 DNA ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)のエキソン領域について、プライマー EadF と EadR (Shimada *et al.* 2007)を用いて PCR 法による DNA 増幅を試みた。また同領域について CT61F (5'-AAGAACTGATATTCTTGACAGCTTTTCG-3'; 28mer)と CT701R (5'-ACCAGCTGTTGCATTTAAATAATGTCCT-3'; 28mer)を新たに Primer 3 web version 4.0.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>; 2016 年 1 月 24 日現在)を利用してデータベース上のデータ(KF572040)から作成し、DNA 増幅を試みた。PCR 反応液は 10 μ M プライマー各 2 μ L, 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 10 μ L, KOD FX Neo (1 U/ μ L) 0.5 μ L, 鋳型 DNA 溶液 2 μ L, 2 mM dNTPs 3.5 μ L をよく攪拌し計 20 μ L 調整した。0.2mLPCR チューブに注入し、ASTEC 製サーマルサイクラー PC-708 を用いて PCR 反応を行った。この反応液を 94°C 4 分間初期加熱した後、94°C 15 秒の熱変性・60°C 15 秒のアニーリング・68°C 30 秒の伸長反応を 35 サイクル行った後、68°C 7 分間伸長反応を行い、10°C で保存した。PCR 産物を Roche High Pure PCR Product Purification Kit を用いて精製し、北海道システムサイエンス社に委託して上流と下流から塩基配列を解読した。解読したデータは MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS

* 兵庫県立兵庫高等学校

** 兵庫県立尼崎小田高等学校

2016年1月25日受理



図1 ウスバミルの藻体 A, B, C (2015 年 4 月 5 日 須磨海岸での打ち上げ採集)
D, E (2015 年 7 月 2 日 垂水福田川尻南方での付着個体) スケール:10 cm

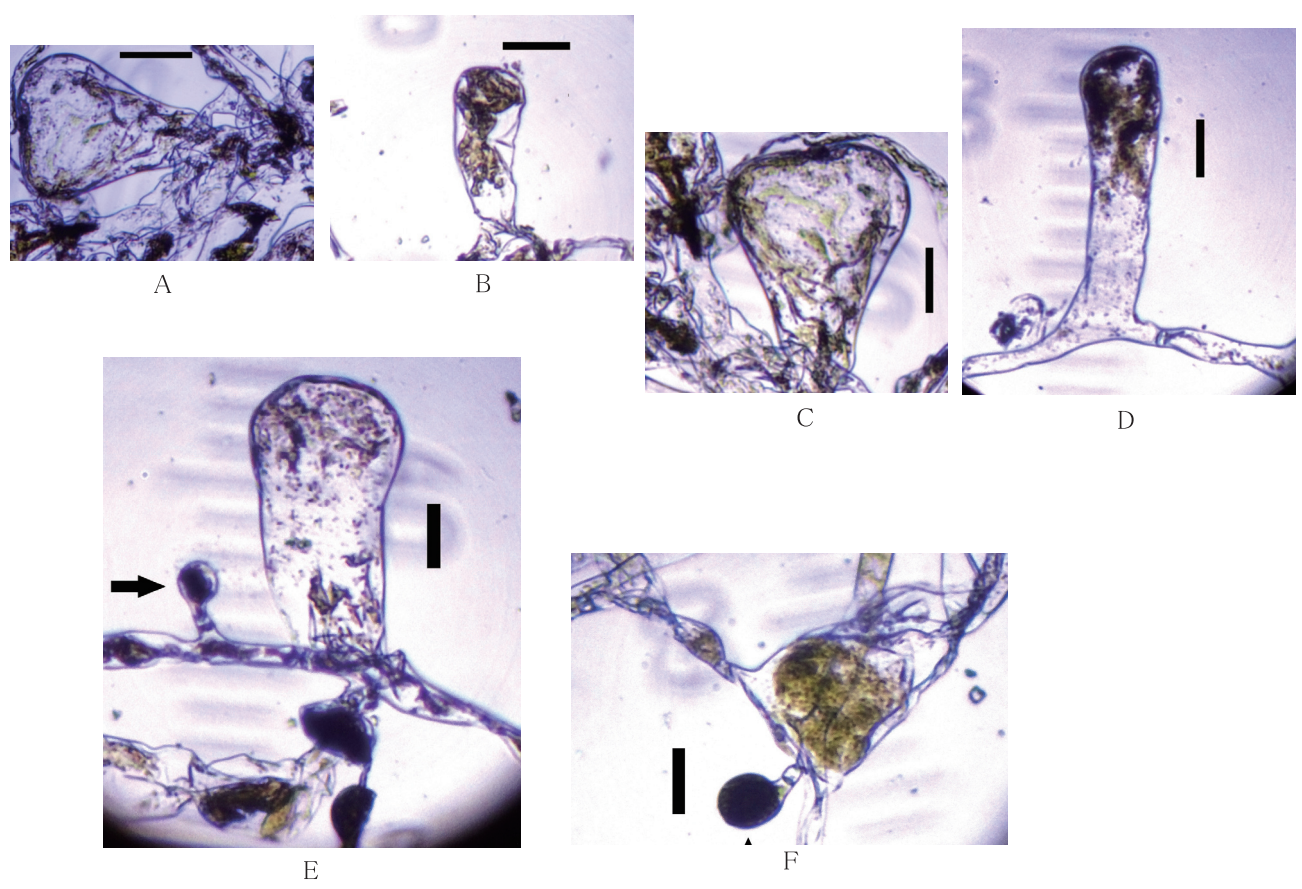


図2 藻体の小嚢 須磨 A, B 垂水 C, D, E, F 矢印: 栄養生殖器官 スケール: 100 μ m (A~F)

表 1 DNA 抽出を行った標本

Collection Site	Collector	Voucher	Collection date	DDBJ No.
Suma beach ; 兵庫県神戸市須磨区須磨海岸	H. Nashima	150002	5-Apr-2015	LC121526
Suma beach ; 兵庫県神戸市須磨区須磨海岸	H. Nashima	150003	5-Apr-2015	LC121527
Suma beach ; 兵庫県神戸市須磨区須磨海岸	H. Nashima	150004	5-Apr-2015	LC121528
Suma beach ; 兵庫県神戸市須磨区須磨海岸	H. Nashima	150005	5-Apr-2015	LC121529
Suma beach ; 兵庫県神戸市須磨区須磨海岸	H. Nashima	150006	5-Apr-2015	LC121530
Tarumi ; 兵庫県神戸市垂水区福田川尻	M. Sakaguchi	150007	2-Jul-2015	LC121531
Tarumi ; 兵庫県神戸市垂水区福田川尻	M. Sakaguchi	150008	2-Jul-2015	LC121532

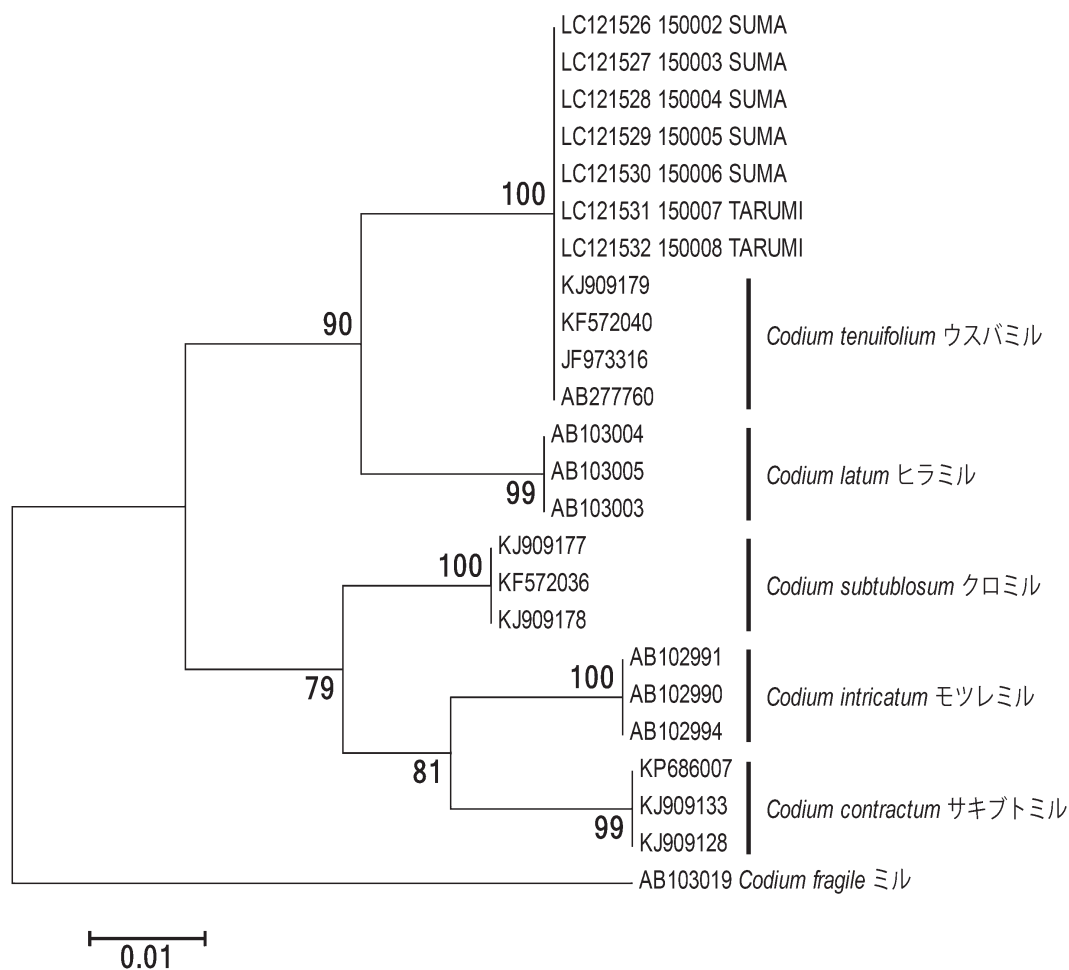


図3 rbcL の塩基配列をもとに須磨，垂水の藻体（150002 SUMA～150008 TARUMI）とウスバミルや近縁種を比較して作った分子系統樹

ANALYSIS 6 (MEGA 6) (Tamura *et al.* 2011)でアライメントし，上流と下流から解読したデータが完全に一致する部分のみを解析に用いた。*C. fragile*（ミル：GenBank accession AB103019）を外群として用いた。また配列の近い日本産ミル属を解析に使用した。系統樹の作成も MEGA6 で行った。

結 果

資料 1

採集日および場所

2015 年 4 月 5 日（日）神戸市須磨海岸（北緯 34° 38′ 25″，東経 135° 06′ 26″）

藻体 色は深緑，付着部は 1×2 mm，1～2 mm 幅の柄を持つ。形は二裂もしくは三裂する逆三角形，大

きさはおよそ 10cm×10cm, 厚さ約 1 mm であった (図 1 A~C)。奈島 打上げ採集。

小囊 形は棍棒状が最も多く, 円柱状や逆円錐状のものも観察された (図 2A, B)。

小囊の長さは $265 \pm 30 \mu\text{m}$ 先端部分の直径は $137 \pm 35 \mu\text{m}$ 基部付近の直径は $106 \pm 24 \mu\text{m}$ であった。また, (先端部分の直径) / (基部付近の直径) は 1.30 ± 0.19 最大値が 1.67 最小値が 1.07 であった。

資料 2

採集日および場所

2015 年 7 月 2 日 (木) 神戸市垂水沖, 福田川尻南岸南方 350m (北緯 $34^{\circ} 37' 19.1''$, 東経 $135^{\circ} 03' 38.6''$) 水深約 8 m。

藻体 色は濃い深緑, 付着部は $3 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, 3 mm 幅の柄を持つ。形は楕円形, 大きさは $20 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$, 厚さ約 1 mm (図 1 D), あるいは二裂もしくは三裂する逆三角形, 大きさは $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$, 厚さ約 1 mm (図 1 E (さく葉標本))。

小囊 形は棍棒状が最も多く, 円柱状や逆円錐状のものも観察された (図 2 C, D)。

小囊の長さは $280 \pm 20 \mu\text{m}$ 先端部分の直径は $136 \pm 32 \mu\text{m}$ 。基部付近の直径は $102 \pm 22 \mu\text{m}$ であった。また, (先端部分の直径) / (基部付近の直径) は 1.33 ± 0.12 最大値が 1.57 最小値が 1.11 であった。

栄養生殖器官 (Vegetative reproduction structure) 類似の構造を観察した (図 2 E, F)。

DNA 解析

DNA 抽出を行った 7 サンプルから良好な 354 bp の配列が得られた。7 サンプルで配列はすべて一致した。

DNA データベースからこの配列と同じもしくは近い配列を示す日本産ミル属のデータを, ダウンロードした。*C. tenuifolium* (ウスバミル: KJ909179, KF572040, JF973316, AB277760), *C. latum* (ヒラミル: AB103004, AB103005, AB103003), *C. subtubulosum* (クロミル: KJ909177, KF572036, KJ909178), *C. intricatum* (モツレミル: AB102991, AB102990, AB102994), *C. contractum* (サキブトミル: KP686007, KJ909133, KJ909128), さらに外群としてミル *Codium fragile* の塩基配列を用い, Maximum Likelihood 法により 1000 回繰り返し演算し解析したところ, ミル属各種は高い分岐率でそれぞれ独立したグループを形成し, 今回検証した 7 サンプルはすべて *Codium tenuifolium* (ウスバミル) と同一グループに属した (図 3)。

考 察

神戸市から淡路島, 播磨灘にかけて, 今まで海藻植生が調べられてきた (広瀬 1954; 金沢 1959; 広瀬・

榎本 1965; 川井 2001; 奈島 2002)。しかし, 海岸での採集でヒラミルの報告は無かった。ただ, 瀬戸内海ではヒラミルがまれに産する (稲葉 1988)。ヒラミルの小囊は長さ $400\text{--}600 \mu\text{m}$, 直径 $50\text{--}100\text{--}160 \mu\text{m}$ である (吉田 1998)。Shimada *et al.* (2007) はウスバミルの小囊は長さ $360\text{--}720 \mu\text{m}$, 直径 $48\text{--}160 \mu\text{m}$ と記載している。また, 栄養生殖器官 (Vegetative reproduction structure) の存在を記載し, 遺伝子解析によってヒラミルと別種であるとして新種記載した (Shimada *et al.* 2007)。Lee and Kim (2011) は韓国で 2008 年に報告した *C. tapetum* や新たに済州島や朝鮮半島, 日本で採集した扁平なカーペット状の個体を遺伝子解析してそれがウスバミルであるとし, その小囊の長さは $260\text{--}410 \mu\text{m}$, 直径 $85\text{--}160 \mu\text{m}$ と記載した。また, 柴田 (2014) は愛媛県松山海岸からウスバミルの採集を報告している。それによると, 小囊の長さの平均は $289 \mu\text{m}$, 直径 $117 \mu\text{m}$ で栄養生殖器官の存在を報告している。本研究の 2015 年 4 月須磨海岸で採集された個体は小囊の長さは $265 \pm 30 \mu\text{m}$, 直径が $106 \pm 24 \mu\text{m}$ であった。また, 7 月垂水で採集された個体は小囊の長さは $280 \pm 20 \mu\text{m}$ 直径は $102 \pm 22 \mu\text{m}$ であった。この結果は Shimada *et al.* (2007) の記載したものより小さいものの, Lee and Kim (2011) や柴田 (2014) の結果とほぼ一致し, また, 7 月の個体からは栄養生殖器官と思われる構造も観察した。また, *rbcL* の DNA 解析の結果もウスバミルと同一グループに属し, 他のミル属の種とは別グループに属した。

これらの事から 4 月に須磨で採集された布状のミルと 7 月に垂水で採集された布状のミルは共に 2007 年新種記載されたウスバミルであった。

有山 (2014) は大阪湾海岸生物研究会のブログで 1996 年に大阪府岬町の深日漁港で採集しヒラミルと報告したものは外部や小囊の形態からウスバミルと思われると述べている。また, 柴田 (2014) も愛媛県松山からウスバミルを報告した。今回の研究で須磨, 垂水でウスバミルが採集されたことは瀬戸内海へ分布を広げている可能性がある。

謝 辞

神戸市垂水沖で採集し布状のミル数個体を阪口正樹氏よりいただき, ウスバミルの可能性を伝えていただいた。深く感謝いたします。遺伝子解析をご指導いただいた笠原恵先生に感謝いたします。

引用文献

- 有山啓之. 2014. 大阪湾のミル類. 大阪湾海岸生物研究会ブログ. <http://d.hatena.ne.jp/osakawan/comment/20140718>.
- Carvalho, M. de O., M. C. Oloveira, S. O. B. Pereira and H. Verbruggen. 2012. Phylogenetic analysis of

- Codium* species from Brazil, with the description of the new species *C. pernambucensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). Eur. J. Phycol., 47(4):355-365.
- 広瀬弘幸. 1954. 南淡路島産の海藻. 兵庫生物, 2:205-206.
- 広瀬弘幸・榎本幸人. 1965. 淡路島岩屋の海藻. 兵庫生物, 5:8-11.
- 稲葉明彦. 1988. 瀬戸内海の生物相 II. 475pp. 広島大学向島臨海実験所, 広島.
- 金沢竜. 1959. 播磨産海藻目録 (予報). 兵庫生物, 3: 379-382.
- 川井浩史. 2001. 神戸の海藻. 146pp. 財団法人神戸市体育協会, 神戸.
- Lee, H. W. and M. S. Kim. 2011. Taxonomic re-examination of a carpet-like *Codium* (Chlorophyta) from Jeju, Korea. Algae, 26(3):221-227
- 奈島弘明. 2002. 須磨海岸の海藻. 兵庫生物, 12(3): 141-145.
- 柴田健介. 2014. 瀬戸内海で記録されたウスバミルとオオハイミル(アオサ藻綱, ハネモ目, ミル科). 南紀生物, 56(1): 30-33.
- Shimada, S., T. Tadano and J. Tanaka. 2007. *Codium tenuifolium* (Codiales, Chlorophyta), a new species from Japan. J. Jpn. Bot., 82:117-125.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Molecular Biology and Evolution, 30(12):2725-2729.
- 吉田忠生. 1998. 新日本海藻誌. 1248pp. 内田老鶴圃, 東京.